

CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Ursula Scherz of Schlesierstr. 8, 81669 München,
Germany,

state that the attached document is a true and complete
translation to the best of my knowledge of the German
Priority Document 198 52 800.0.

Dated: July 2, 2001

Signature of Translator: Ursula Scherz

)

URSULA SCHERZ
Translator for the English
language duly registered,
commissioned and sworn in
by the München I Regional Court

Certified translation of a priority document

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent
Application**

File No.: 198 52 800.0

Date of Filing: November 16, 1998

Applicant/Patentee: GENOVAC AG, Freiburg/Germany

First Applicant: Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg, Freiburg/Germany

Title: Process for Preparing Antibodies Against
a Polypeptide, the Encoding Nucleic Acid
of Which is Known

IPC: C 07 K 16/00

**The attached sheets are a true and exact reproduction of
the original documents of this patent application.**

München, June 21, 2001

German Patent and Trademark Office

The President

Seal:

by order

German Patent and

(signature)

Trademark Office

Faust

(Letterhead of Patent Attorneys Lederer, Keller +
Riederer)

5

10

November 16, 1998

15

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Hugstetter Str. 49
79106 Freiburg

**Process for Preparing Antibodies Against a Polypeptide,
the Encoding Nucleic Acid of Which is Known**

20

Because of the enormous advances which have been made in the possibilities for sequencing nucleic acids, the problem frequently arises in molecular biology that, while the genetic information for a polypeptide or protein is known, this polypeptide or protein is not available in pure form. While nucleotide sequences are continually being published as a result of the Human Genome Project, the functions possessed by the polypeptides or proteins encoded by these genes are frequently completely unknown.

30

As a rule, it is very helpful for the practical application and evaluation of these scientific findings if these proteins can be detected using suitable antibodies. Such antibodies can be used either to purify the proteins or, for example, to determine the location of the proteins in tissues and cells.

35

An object of the present invention is therefore to make available antibodies which are directed against

such polypeptides or proteins, the nucleotide sequences for which are known but which are not available in enriched, and certainly not in purified, form.

Conventionally, antibodies are prepared by the proteins first of all being purified from the cells or the tissue, or being prepared recombinantly using bacteria, or in insect cells or mammalian cells, and these proteins being used for immunizing animals. These methods are frequently very elaborate and long-winded. The proteins which have been prepared in bacteria are frequently not identical to the naturally occurring proteins since their secondary structure may differ from that of the native proteins and since bacteria do not possess the same post-translational modification mechanisms as those which are present in eucaryotic organisms.

The subject matter of the present invention is therefore a process for producing antibodies which react specifically with a polypeptide, the encoding nucleic acid of which is known, in which process

- a) the DNA encoding the polypeptide is expressed in a host cell using a vector which possesses at least one sequence encoding a detection signal, and the expressed polypeptide is bound to a solid phase with the aid of the detection signal,
- b) independently of step a), the DNA encoding the polypeptide is introduced directly into an animal, resulting in expression of a polypeptide in the animal, which expression causes the formation of antibodies against the polypeptide, and
- c) the antibodies which are formed in step b) are reacted with the polypeptide formed in step a) and detected or enriched.

The process according to the invention essentially consists of three steps. On the one hand,

the DNA encoding the polypeptide is expressed in a suitable host cell using a vector (step a)). Since the polypeptide which is expressed using the vector is as a rule only present at relatively low concentration in the host cell, the vector employed is provided, according to the invention, with a nucleotide sequence which encodes a detection sequence (tag sequence). This tag sequence is linked to the sequence encoding the polypeptide, resulting in the expressed polypeptide possessing this detection peptide sequence at the C terminus, for example.

In step b), which is carried out independently of step a), the DNA encoding the polypeptide is introduced into a suitable animal and expressed in this animal. The genetic immunization which is employed in accordance with the invention enables antibodies to be formed directly in a host animal.

In this method of preparing antibodies, purified DNA, which contains the genetic information for the protein to be investigated and suitable control elements, is injected directly into the organism (mouse, rabbit, etc.) which is earmarked for the antibody production. The DNA is taken up by the cells of the recipient organism and the protein is expressed in native form (i.e. with correct post-translational modifications). The protein, which is foreign as far as the recipient organism is concerned, induces the immune system to produce antibodies which are directed against the foreign antigen (humoral immune response). This method has already been employed successfully for producing high-affinity monoclonal antibodies which recognise native proteins.

The expression vectors which are employed for the genetic immunization in step b), for the purpose of preparing the desired antibodies, are also to be used in vitro for producing the target protein. Transient transfection (electroporation, lipofection, etc.) is used to introduce the expression vectors into suitable target cells, in particular mammalian cells, which then

synthesize the desired protein. These cells (intact or following lysis with suitable buffers) or medium supernatants (in the case of secreted proteins) are to be used for detecting the protein-recognizing antibody by means of FACScan analyses (in the case of proteins which are located in the cell) or ELISA.

When a foreign polypeptide is expressed in a host cell, the expressed polypeptide can usually be secreted to the exterior using a secretion sequence or leader sequence. In these cases, it is important that the expressed and secreted polypeptide possesses a detection signal which can be used to isolate the polypeptide from the medium. If, however, the polypeptide is not secreted to the exterior but remains on the surface of the cell membrane, an additional detection sequence is then not absolutely necessary. In this case, the site in the polypeptide which is responsible for the anchoring between polypeptide and cell assumes the function of the detection sequence. Since, in this case, the expressed polypeptide remains linked to the cell, the antibodies which are formed can be detected by means of FACScan analyses, by binding to the polypeptide and subsequently reacting with a fluorescence-labeled antibody. As an alternative, it is also possible to carry out a cell ELISA in which the bound antibodies are detected using an enzyme-coupled secondary antibody and a suitable substrate reaction.

In the case of secreted proteins (where appropriate, also in the case of proteins which are expressed intracellularly), it is necessary to attach a detection sequence (a tag) to the antigen recombinantly. This tag sequence enables the protein to be fished out of the cell supernatant or cell lysate using substances which interact with the tag sequence and which are bound to a solid matrix (e.g. antibodies which recognise the tag sequence; in the case of the His₆ tag sequence, suitable complexed Ni²⁺ ions). Peptide sequences which are short and/or not very immunogenic are particularly suitable tag sequences.

Mouse proteins which have a stimulatory effect on antibody production (e.g. GM-CSF, IL-4, IL-10, etc.) and which at the same time are able to function as tags can be used as tag sequences which are not particularly immunogenic (i.e. for preparing antibodies in mice). Such tags have the advantage of not developing any immune response because of the tolerance of the immunized animal towards these self-proteins. If it is not possible to prevent the formation of antibodies which recognise the tag sequence of a recombinant protein, these antibodies can be identified using constructs which encode irrelevant proteins which are provided with an identical tag.

The immobilized protein, which has been prepared by transient transfection, is now used to bind the antibodies, which recognise it, from the serum or the hybridoma culture supernatant (when preparing monoclonal antibodies). The bound, specific antibodies are then detected using enzyme-coupled anti-antibodies (detection antibodies) which are quantifiable, as a rule photometrically, by way of a specific substrate reaction. When using peptide tags, the specificity and sensitivity of the detection system can be significantly increased if $F(ab)_2$ fragments of the anti-tag antibody are used as captor antibodies and an Fc region-recognising antibody is used as the detection antibody. This configuration of the ELISA rules out any cross-recognition of the captor antibody.

The vector which encodes the polypeptide can have a polyadenylation sequence, which is required for stabilizing a eucaryotic mRNA, at its 3' end.

In order to ensure that the polypeptide is expressed in the host cell, the vector normally possesses a promoter, with preference being given to using strong promoters. Examples which may be mentioned are the elongation factor 1α promoter or the cytomegalovirus promoter.

In the process according to the invention, the nucleic acid encoding the polypeptide is introduced

directly into an animal in order to produce antibodies against the polypeptide in this animal. In a preferred form, the DNA which is employed for this purpose is present in the form of a vector which is selected such
5 that it can be used for the two steps a) and b) at one and the same time. In a particularly preferred embodiment, the polypeptide-encoding DNA is introduced using a so-called gene gun. In the gene gun method, microscopically small gold particles are coated with
10 the DNA, preferably the vector or plasmid DNA, and shot at the shaved skin of the experimental animal. The gold particles then penetrate into the skin and express the DNA which has been applied to them in the host animal. Preference is given, according to the invention, to
15 using laboratory animals such as mice, rats or rabbits.

In order to achieve a more vigorous antibody formation, so-called genetic adjuvants are, in a preferred embodiment, also applied simultaneously with the polypeptide-encoding DNA. These genetic adjuvants
20 are plasmids which express cytokines (such as GM-CSF, IL-4 and IL-10) and which stimulate the humoral immune response in the laboratory animals.

Particularly when the laboratory animal employed is a mouse or a rat, there is the opportunity
25 of forming hybridoma cells. The immunized mice are sacrificed, spleen cells are isolated and fused with tumor cells, and those clones which secrete the desired monoclonal antibodies are then selected.

In a particularly advantageous embodiment, the
30 polypeptides to be investigated are secreted from the host cells in step a). Since a detection signal is linked to the polypeptides, the sought-after polypeptides can be isolated by forming a bond between the detection signal (tag sequence) and a suitable
35 ligand. The tag sequence is preferably bound to a solid phase. This solid phase can be the walls of microtiter plates, gel spheres or else magnetic beads. Magnetic beads have the advantage that the solution containing the expressed polypeptide can be readily mixed with the

magnetic beads. The magnetic beads possess a ligand (for example antibody fragments) which binds to the tag sequence. The magnetic beads can then be concentrated by applying a magnetic field. By choosing suitable conditions, the sought-after polypeptide can then be eluted once again from the magnetic beads when the antibodies are to be enriched.

The subject matter of the present invention also relates to the antibodies which can be obtained using the process according to the invention.

The present invention is explained in more detail with the aid of the following examples.

Example 1

Preparing murine monoclonal antibodies by means of genetic immunization without purified antigen (protein)

a) Expression construct for the genetic immunization

An expression construct based on the commercially available expression vector pcDNA3 (Invitrogen) was selected. In this vector, the cDNA is expressed under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter. However, it is also possible to use other, preferably strong, usually ubiquitously active promoters (e.g. the promoter of the elongation factor 1 α [EL-1 α] gene). The human cDNA region encoding the extracellular domain of thyroid peroxidase (TPO) (2602 bp; 859 amino acids) was cloned into the BamHI/EcoRV cleavage sites in the polylinker sequence and additionally provided, at the 3' end, with a region encoding a His₆ tag and a subsequent stop codon (TPO sol.-His-pcDNA3). The plasmid DNA was replicated in E. coli and purified using a Qiagen plasmid isolation kit (Qiagen, Hilden).

b) Genetic immunization of mice

In principle, there are two different methods for administering DNA for the genetic immunization. These methods are intramuscular injection or intracutaneous administration using gas pressure-accelerated, microscopically small gold particles coated with plasmid DNA (gene gun). We used the gene gun method for the Example. For this, 200 µg of TPO sol.-His-pcDNA3 DNA were applied per 25 mg of gold particles in accordance with the manufacturer's instructions (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, Munich). For the genetic immunization, the abdominal fur (approx. 4 cm²) was removed, using perfume-free depilation cream (Veet), from five mice after they had been anaesthetized (intraperitoneally) with 110 µl of ketamine/xylazine (100 mg/kg/16 mg/kg); the mice were then bombarded twice with the gene gun (Helios gene gun; Bio-Rad). 1 µg of plasmid DNA was administered per "bombardment". The immunization was repeated after 19 days, and blood was withdrawn 14 days later for determining the quantity of specific antibodies.

Example 2

Expressing the protein encoded by the expression construct

The protein encoded by the expression plasmid has to be prepared in order to detect the specific antibodies which are formed as a result of the genetic immunization. In order to obtain the protein in native form (as in the immunized animal), the expression construct was introduced by transfection into BOSC23 cells [Pear et al., (1993) PNAS, 84, 8392-8396]. BOSC23 cells are a modified adenovirus 5-transformed human embryonic kidney cell line (HEK293) which can be transiently transfected very satisfactorily. The cells were plated out in 6-well cell culture dishes such that they reached 80% confluence on the following day. They were then washed three times with in each case 2 ml of serum-free and antibiotic-free *Dulbecco's modified*

Eagle's medium (DMEM) medium and treated with 2 µg of expression plasmid/10 µl of lipofectamine (Life Technologies, Eggenstein) in 1 ml of serum-free and antibiotic-free DMEM medium. The DNA/lipofectamine/medium mixture had previously been pipetted together in a polystyrene vessel and incubated for 10 minutes at room temperature. Following a 6-hour incubation at 37°C and 10% CO₂, 2 ml of DMEM/20% fetal calf serum (FCS) were added. 24 h after transfection (corresponds to the time at which the DNA was added), the medium was replaced with 5 ml of DMEM/5% FCS. After a further 48 h (72 h after transfection), the cell culture supernatant was removed and stored at -70°C.

Example 3

Detecting specific antibodies which are directed against the protein encoded by the expression construct

In order to bind the His₆ tag protein (TPO sol.-His) prepared by transient transfection to nickel chelate microtiter plates (DUNN, Asbach), the wells were in each case incubated, overnight at 4°C, with 200 µl of supernatant from the transient transfection mixture (see above) or of a mock-transfected BOSC23 culture supernatant and then washed 4 times with buffer A (50 mM tris/HCl, pH 7.5, 1 M NaCl) and twice with buffer B (phosphate-buffered saline (PBS), 0.1% BSA, 0.05% Tween 20). Nonspecific binding sites were then blocked by incubating with 300 µl of 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS at room temperature for 1 h, after which the washes with buffer A and buffer B were repeated. The pre-immune sera and the immune sera from the immunized mice were diluted 1:100 with buffer B. In each case 100 µl of the diluted mouse sera were added to the wells of the nickel chelate microtiter plates. After incubating at room temperature for 1 hour, the wells were in each case washed four times with buffer C (50 mM tris/HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1% BSA, 0.05%

Tween 20) and twice with buffer B and then treated with 100 µl of rabbit anti-mouse Ig peroxidase conjugate (DAKO, Hamburg) diluted 1:2000 with buffer B. After a one-hour incubation, the wells were washed four times
5 with buffer C and twice with buffer B and in each case treated with 100 µl of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Fluka, Buchs, Switzerland). After sufficient development, the color reaction was stopped by adding 50 µl of 0.5 M H₂SO₄ and measured in an ELISA
10 reader at a wavelength of 450 nm.

In order to check the serviceability of the invention which is presented here, the specific antibodies directed against TPO were detected "classically" by means of a commercially available TPO
15 antibody ELISA (Varelista TPO antibody; Pharmacia-Upjohn, Freiburg). In this test system, anti-TPO antibodies are detected using purified recombinant TPO. The content of anti-TPO antibodies in the pre-immune and immune sera from the immunized mice was determined
20 at a dilution of 1:100 in accordance with the manufacturer's instructions.

Results:

25 It was possible to detect anti-TPO antibodies unambiguously, as compared with the pre-immune sera, at a dilution of 1:100, in the serum obtained from all the five mice which were immunized with TPO sol.-His-pcDNA3 DNA. The results are presented in Table 1.

30

Table 1: Detection of anti-TPO antibodies in the serum of TPO sol.-His-pcDNA3 DNA-immunized mice using purified TPO protein (*Varelista TPO Antibodies* detection system).

Mouse	Optical density _{450 nm}	
	Pre-immune serum	Immune serum
GV1	0.09	2.53
GV2	0.06	1.97
GV3	0.07	1.13
GV4	0.08	1.63
GV5	0.08	0.60

The detection system according to the invention
 5 was used to investigate the pre-immune serum and immune
 serum from two mice as an example. The mouse having the
 highest anti-TPO antibody concentration (GV1) and the
 mouse having the lowest anti-TPO antibody concentration
 (GV5) were selected. As can be seen from Table 2, it is
 10 possible to detect, in both mice, anti-TPO antibodies
 unambiguously, at a serum dilution of 1:100, in the
 immune serum whereas the pre-immune serum did not
 exhibit any reaction. At a dilution of 1:500, it was no
 longer possible to detect anti-TPO antibodies in the
 15 immune sera.

Table 2: Detection of anti-TPO antibodies in the serum
 of TPO sol.-His-pcDNA3 DNA-immunized mice using TPO
 sol.-His protein which was produced by transient
 20 expression.

Serum or buffer	Dilution with buffer A	Optical density	
		TPO sol.-His	Medium
pre-immune	1:100	0.17	0.15
immune	1:100	0.55	0.19
buffer A	--	0.03	0.01

Example 4**Preparing polyclonal antibodies by means of genetic immunization without purified antigen (protein) in rabbits***a) Expression construct for the genetic immunization*

For the second case example, the ubiquitously active promoter of the elongation factor 1 α (EF-1 α) gene was used for controlling the expression. The expression vector employed is based on the pBluescript vector (Stratagene, Heidelberg), into which a 1.2 kb fragment of the human EF-1 α gene promoter, an 0.7 kb EcoRI fragment containing the polyadenylation signal from the cDNA for human G-CFS (Mizushima and Nagata, 1990), and also, between the BamHI and NotI cleavage sites, the oligonucleotide sequence encoding the influenza virus hemagglutinin (HA) tag were incorporated. The human cDNA region encoding the extracellular domain of the activin receptor IIA (431 bp; 135 amino acids) was cloned into the ClaI/BamHI cleavage sites of the polylinker sequence such that the HA tag-encoding region and a subsequent stop codon came to lie at the 3' end (pEF-1 α -ActRII-HA).

b) Genetic immunization of rabbits

For the genetic immunization, 100 μ g of pEF-1 α -ActRII-HA DNA were applied per 25 mg of gold particles in accordance with the manufacturer's instructions (gene gun optimization kit; Bio-Rad, Munich). After having been anaesthetized with 15 mg of pentobarbital/kg and having 200 cm² of the abdominal fur depilated with depilation cream, two rabbits (Chinchilla Bastard; Charles River, Sulzfeld) were bombarded 30 times with the gene gun. 1 μ g of plasmid DNA mixture was administered per "bombardment". The immunization was repeated after 21 days and blood was

removed 21 days later for determining the quantity of specific antibodies.

Example 5

5

Expressing the protein encoded by the expression construct

The protein encoded by the expression plasmid pEF-1 α -ActRII-HA was prepared, as described in Example 2, by transiently transfecting BOSC23 cells.

Example 6

15 *Detecting specific antibodies which are directed against the protein encoded by the expression construct*

In order to bind the HA tag protein (EF-1 α -ActRII-HA), prepared by transient transfection, to microtiter plates, the wells were first of all coated with the F(ab)₂ fragment of the anti-HA tag antibody. For this, 150 μ l of the antibody fragment were added to each well of the microtiter plate, after which the plate was washed with PBS at room temperature and free protein-binding sites were blocked by incubating with 200 μ l of 0.2% BSA/PBS/well.

The supernatant from the transient transfection mixture (see Example 5), or from a mock transfected BOSC23 culture supernatant[sic], was then incubated at room temperature for 2 h, after which the plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). The pre-immune sera and immune sera from the immunized rabbits were diluted 1:100 and 1:500, respectively, with 0.2% BSA/PBS. 100 μ l of the diluted rabbit sera were in each case added to the wells of the coated microtiter plates. After the plates had been incubated at room temperature for one hour, the wells were in each case washed three times with PBS, after which 100 μ l of goat anti-rabbit Ig peroxidase

conjugate (DAKO, Hamburg), diluted 1:2000 with PBS/0.2% BSA) were added to each well. After the plate had been incubated for one hour, the wells were washed three times with PBS, after which 100 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Fluka, Buchs, Switzerland) were added to each well. After it had developed sufficiently, the color reaction was stopped by adding 50 μ l of 0.5 M H_2SO_4 to each well and measured in an ELISA reader. The results showed that it is also possible to use the process according to the invention to produce specific polyclonal antibodies against an unknown gene product in rabbits.

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Patent claims

- 5 1. Process for producing antibodies which react specifically with a polypeptide, the encoding nucleic acid of which is known, wherein
- 10 a) the DNA encoding the polypeptide is expressed in a host cell using a vector which possesses at least one sequence encoding a detection signal, and the expressed polypeptide is bound to a solid phase with the aid of the detection signal,
- 15 b) independently of step a), the DNA encoding the polypeptide is introduced directly into an animal, resulting in expression of a polypeptide in the animal, which expression causes the formation of antibodies against the polypeptide, and
- 20 c) the antibodies which are formed in step b) are reacted with the polypeptide formed in step a) and detected or enriched.
2. Process according to claim 1, characterized in
- 25 that the vector used in step a) possesses, at the C-terminus of the DNA encoding the polypeptide, a sequence which encodes the detection signal.
3. Process according to claim 2, characterized in that the detection sequence is selected from the His₆
- 30 tag sequence, the hemagglutinin sequence of an influenza virus or the myc tag sequence.
4. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the vector encoding the polypeptide possesses a polyadenylation sequence at the
- 35 C-terminal end of the detection sequence.
5. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the vector encoding the polypeptide possesses a strong promoter at the 5' end of the DNA sequence encoding the polypeptide.

6. Process according to claim 5, characterized in that the strong promoter is selected from the group consisting of strong eucaryotic promoters, in particular the elongation factor 1 α promoter or the
5 cytomegalovirus promoter.

7. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the polypeptide-encoding DNA, which is introduced directly into an animal in accordance with step b), is present in a vector.

10 8. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the polypeptide-encoding DNA is introduced into the animal in step b) using a gene gun.

9. Process according to one of the preceding
15 claims, characterized in that the animal employed in step b) is a mouse, a rat or a rabbit.

10. Process according to one of the preceding claims, characterized in that, in step b), a genetic adjuvant is administered in addition to the
20 polypeptide-encoding DNA.

11. Process according to claim 10, characterized in that the genetic adjuvant is selected from a group comprising cytokine expression vectors which increase antibody production.

25 12. Process according to one of the preceding claims, characterized in that suitable cells from an animal which has been immunized in accordance with step b) are used for preparing hybridoma cells for forming monoclonal antibodies.

30 13. Process according to one of the preceding claims, characterized in that polypeptide formed in step a) is bound to a solid phase by means of the detection signal being bound to an antibody or an antibody fragment which is directed against it.

35 14. Process according to claim 13, characterized in that the solid phase is microtiter plates, gel spheres or magnetic beads.

15. Process according to one of the preceding claims, characterized in that the antibody formed in

step b) is detected, after having been bound to the polypeptide formed in step a), using an anti-antibody which is directed against the antibody.

16. Process according to one of the preceding
5 claims, characterized in that the antibody which is bound to the expressed polypeptide in step c) is released by elution.

17. Antibody, characterized in that it can be
obtained using one of the processes according to claims
10 1-17[sic].

Abstract

5 A process is disclosed for producing antibodies
which react specifically with a polypeptide, the
encoding nucleic acid of which is known, wherein

10 a) the DNA encoding the polypeptide is expressed in a
host cell using a vector which possesses at least
one sequence encoding a detection signal, and the
expressed polypeptide is bound to a solid phase
with the aid of the detection signal,

15 b) independently of step a), the DNA encoding the
polypeptide is introduced directly into an animal,
resulting in expression of a polypeptide in the
animal, which expression causes the formation of
antibodies against the polypeptide, and

20 c) the antibodies which are formed in step b) are
reacted with the polypeptide formed in step a) and
detected or enriched.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 52 800.0

Anmeldetag: 16. November 1998

Anmelder/Inhaber: GENOVAC AG, Freiburg/DE

Erstanmelder: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
Freiburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen ein
Polypeptid, von dem die kodierende Nukleinsäure
bekannt ist

IPC: C 07 K 16/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

LEDERER, KELLER & RIEDERER

Patentanwälte - European Patent Attorneys

DR. A. VAN DER WERTH
(1934 - 1974)

DR. FRANZ LEDERER
Dipl.-Chem. München

DR. GÜNTER KELLER
Dipl.-Biol. München

DR. MICHAEL BEST
Dipl.-Chem. München

ANTON FRH. RIEDERER v. PAAR
Dipl.-Ing. Landshut

80538 MÜNCHEN
Prinzregentenstraße 16
Telefon (089) 21 23 99 0
Telefax (089) 21 23 99 22
E-Mail lederer_keller@compuserve.com

16. Nov. 1998

Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg
Hugstetter Str. 49

79106 Freiburg

**Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen ein Polypeptid,
von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist**

① In der Molekularbiologie stellt sich aufgrund der enormen Fortschritte der Sequenzierungsmöglichkeiten von Nukleinsäuren häufig das Problem, daß die genetische Information für ein Polypeptid bzw. Protein bekannt ist und, daß andererseits dieses Polypeptid bzw. Protein nicht in reiner Form vorliegt. Durch das sogenannte Human Genome Project werden laufend Nukleotidsequenzen veröffentlicht, häufig ist aber völlig unklar, welche Funktion die von diesen Genen kodierten Polypeptide bzw. Proteine haben.

Für die praktische Anwendung und Auswertung dieser wissenschaftlichen Erkenntnisse ist es in der Regel sehr hilfreich, wenn diese Proteine durch geeignete Antikörper nachgewiesen werden können. Durch den Einsatz derartiger Antikörper können entweder die Proteine gereinigt werden oder

Es ist beispielsweise möglich, die Lokalisation der Proteine in Geweben und Zellen zu bestimmen.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper bereitzustellen, die gegen solche Polypeptide bzw. Proteine gerichtet sind, von denen zwar die Nukleotidsequenz bekannt ist, die aber nicht in angereicherter oder gar gereinigter Form vorliegen.

Örkömmlicherweise werden Antikörper so hergestellt, daß zunächst die Proteine aus den Zellen oder dem Gewebe gereinigt werden oder mit Hilfe von Bakterien oder in Insektenzellen oder Eukaryotenzellen rekombinant hergestellt werden und, daß diese Proteine dann für die Immunisierung von Tieren verwendet werden. Diese Verfahren sind häufig sehr aufwendig und schwierig. Im Falle der Herstellung in Bakterien sind die so hergestellten Proteine häufig nicht identisch mit den natürlich vorkommenden Proteinen, da sich die Sekundärstruktur von den nativen Proteinen unterscheiden kann und da Bakterien nicht über dieselben posttranslationalen Modifikationsmechanismen verfügen, die bei eukaryotischen Organismen vorhanden sind.

○ Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,

b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine

Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und

die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht im wesentlichen aus drei Schritten. Einerseits wird die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors in einer geeigneten Wirtszelle transformiert (Schritt a)). Da das mit Hilfe des Vektors transformierte Polypeptid in der Wirtszelle in der Regel nur in einer verhältnismäßig geringen Konzentration vorliegt, wird erfindungsgemäß der eingesetzte Vektor mit einer Nukleotidsequenz versehen, die für eine Auffindungssequenz (tag-Sequenz) kodiert. Diese tag-Sequenz ist mit der für das Polypeptid kodierenden Sequenz verbunden, was dazu führt, daß das exprimierte Polypeptid zum Beispiel am C-Terminus diese Auffindungspeptidsequenz aufweist.

Unabhängig von Schritt a) durchgeführten Schritt b) wird die für das Polypeptid kodierende DNA in ein geeignetes Tier eingebracht und dort zur Expression gebracht. Die erfindungsgemäß verwendete genetische Immunisierung ermöglicht die direkte Bildung von Antikörpern in einem Wirtstier.

Bei dieser Methode der Herstellung von Antikörpern wird gereinigte DNA, die die genetische Information für das zu untersuchende Protein und geeignete Steuerelemente enthält, direkt in den für die Antikörperproduktion vorgesehenen Organismus (Maus, Kaninchen, etc.) injiziert. Die DNA wird von allen Zellen des Empfängerorganismus aufgenommen und das Protein, in aktiver Form (d.h. mit korrekten posttranslationalen Modifikationen) exprimiert. Das für den Empfängerorganismus fremde Protein veranlaßt das Immunsystem, gegen das fremdantigen gerichtete Antikörper zu produzieren (humorale

immunantwort). Diese Methode ist bereits erfolgreich zur Produktion von hochaffinen, native Proteine erkennenden monoklonalen Antikörpern eingesetzt worden

Die für die genetische Immunisierung in Schritt b) zur Herstellung der gewünschten Antikörper eingesetzten Expressionsvektoren sollen auch *in vitro* zur Produktion des Zielproteins verwendet werden. Durch transiente Transfektion (Elektroporation, Lipofektion, etc.) werden die Expressionsvektoren in geeignete Zielzellen, insbesondere Säugerzellen eingeschleust, die dann das gewünschte Protein synthetisieren. Diese Zellen (intakt oder nach Lyse mit geeigneten Puffern) bzw. Medienüberstände (bei sezernierten Proteinen) sollen dazu dienen, den Protein-erkennenden Antikörper durch FACScan-Analysen (im Falle von zellständigen Proteinen) oder ELISA nachzuweisen.

Wenn ein fremdes Polypeptid in einer Wirtszelle exprimiert wird, kann das exprimierte Polypeptid üblicherweise durch Verwendung einer Sekretionssequenz oder Leadersequenz nach außen geschleust werden. In diesen Fällen ist es wichtig, daß das exprimierte und sezernierte Polypeptid ein Auffindungssignal aufweist, damit das Polypeptid aus dem Medium isoliert werden kann. Wenn aber das Polypeptid nicht nach außen geschleust wird, sondern an der Oberfläche der Zellmembran verbleibt, ist eine zusätzliche Auffindungssequenz nicht unbedingt erforderlich. In diesem Fall übernimmt diejenige Stelle des Polypeptids, die für die Verankerung zwischen Polypeptid und Zelle verantwortlich ist die Funktion der Auffindungssequenz. Da in diesem Fall das exprimierte Polypeptid mit der Zelle verbunden bleibt, können die gebildeten Antikörper durch Bindung an das Polypeptid und nachfolgender Reaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durch FACScan-Analysen nachgewiesen werden. Als alternative ist auch ein Zell-ELISA möglich, bei dem die gebundenen Antikörper über einen mit einem Enzym gekoppelten

sekundärantikörper und einer geeigneten Substratreaktion detektiert werden.

Im Falle von sezernierten Proteinen (ggf. auch bei intrazellulär exprimierten Proteinen) ist es nötig, eine Auffindungssequenz (*tag*) dem Antigen rekombinant anzuhängen. Diese *tag*-Sequenz erlaubt es, mit Hilfe von mit ihr interagierenden, an eine feste Matrix gebundenen Substanzen (z.B. die *tag*-Sequenz erkennende Antikörper; im Falle der His₆-*tag*-sequenz geeignete komplexierte Ni²⁺-Ionen), das Protein aus dem Zellüberstand bzw. Zelllysat herauszufischen. Als *tag*-Sequenzen kommen insbesondere kurze und/oder wenig immunogene Peptidsequenzen in Frage. Als wenig immunogene *tag*-Sequenzen können (für die Herstellung von Antikörpern in Mäusen) auch Ausproteine dienen, die stimulierend auf die Antikörperproduktion wirken (z.B. GM-CSF, IL-4, IL-10 etc.) und gleichzeitig als *tag* fungieren können. Solche *tags* haben den Nachteil, aufgrund der Toleranz des immunisierten Tiers gegenüber diesen Selbstproteinen keine Immunantwort zu entwickeln. Falls die Bildung der die *tag*-Sequenz des rekombinanten Proteins erkennenden Antikörper nicht verhindert werden kann, können diese mit Hilfe von Konstrukten identifiziert werden, die für irrelevante, mit einem identischen *tag* versehene Proteine kodieren.

Das immobilisierte, durch transiente Transfektion hergestellte Protein dient nun dazu, aus dem Serum bzw. Hybridomkulturüberstand (bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern) die es erkennenden Antikörper zu binden. Der Nachweis der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgt dann über enzymgekoppelte Anti-Antikörper (Nachweisantikörper), die über eine spezifische Substratumsetzung, in der Regel photometrisch, quantifizierbar sind. Die Spezifität und Sensitivität des Nachweissystems kann bei Verwendung von Peptid-*tags* bedeutend erhöht werden, wenn als Fängerantikörper (Fab)₂-Fragmente des anti-*tag*-Antikörpers und als

achweisantikörper ein Fc-Region-erkennender Antikörper verwendet wird. Durch diese Konfigurierung des ELISA wird eine Kreuzerkennung des Fängerantikörpers ausgeschlossen.

Der für das Polypeptid kodierende Vektor kann am C-terminalen Ende der Auffindungssequenz eine Polyadenylierungssequenz aufweisen, die für die Stabilisierung einer eukaryotischen mRNA ist.

Um eine Expression des Polypeptids in der Wirtszelle zu bewerkstelligen, verfügt der Vektor üblicherweise über einen Promotor, wobei bevorzugt starke Promotoren verwendet werden. Als Beispiele können der Promotor des Elongationsfaktors α oder der Promotor des Cytomegalovirus genannt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure direkt in ein Tier eingebracht, um dort Antikörper gegen das Polypeptid zu erzeugen. In bevorzugter Form liegt die dazu verwendete DNA in Form eines Vektors vor, der so gewählt wird, daß er gleichzeitig für die beiden Schritte a) und b) verwendet werden kann. Die Einführung der für das Polypeptid kodierenden DNA erfolgt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform durch die Verwendung einer sogenannten gene gun. Bei der gene gun werden mikroskopisch kleine Goldpartikel mit der DNA, bevorzugt der Vektor bzw. Plasmid-DNA umhüllt und auf die rasierte Haut des Versuchstieres geschossen. Dabei dringen die Goldpartikelchen in die Haut ein und die an ihnen aufgebrachte DNA wird in dem Wirtstier exprimiert. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Labortiere, wie Maus, Ratte oder Kaninchen verwendet.

Um eine stärkere Antikörperbildung zu erzielen, werden in einer bevorzugten Ausführungsform zugleich mit der für das Polypeptid kodierenden DNA auch sogenannte genetische Adjuvantien appliziert. Hierbei handelt es sich um Zytokine (wie z.B. GM-

SF, IL-4, IL-10) exprimierende Plasmide, die die humorale Immunantwort in den Labortieren stimulieren.

Insbesondere wenn es sich bei dem verwendeten Labortier um eine Maus oder Ratte handelt, bietet sich die Bildung von Hybridomazellen an. Die immunisierten Mäuse werden geopfert, Milzzellen werden isoliert und mit Tumorzellen fusioniert und anschließend werden solche Klone selektioniert, die die gewünschten monoklonalen Antikörper sezernieren.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform werden bei Schritt a) die zu untersuchenden Polypeptide von den Wirtszellen sezerniert. Da mit den Polypeptiden ein Auffindungssignal verbunden ist, können die gesuchten Polypeptide dadurch isoliert werden, daß eine Bindung zwischen dem Auffindungssignal (tag-Sequenz) und einem geeigneten Liganden gebildet wird. Die tag-Sequenz ist vorzugsweise an einer festen Phase gebunden. Hierbei kann es sich um die Wände von Mikrotiterplatten, Gelkügelchen oder auch magnetische Kügelchen (sogenannte magnetic beads) handeln. Die magnetic beads haben den Vorteil, daß die das exprimierte Polypeptid enthaltende Lösung mit den magnetic beads leicht gemischt werden kann. Die magnetic beads weisen einen Liganden (bspw. Antikörperfragmente) auf, der an die tag-Sequenz bindet. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes können dann die magnetic beads angereichert werden. Durch Wahl geeigneter Bedingungen kann dann das gesuchte Polypeptid von den magnetic beads wieder eluiert werden, wenn die Antikörper angereichert werden sollen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch solche Antikörper, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von murinen monoklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein)

1) Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung

Es wurde ein Expressionskonstrukt gewählt, das auf dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) basiert. Bei diesem Vektor wird die cDNA unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors exprimiert. Es können jedoch auch andere, bevorzugt starke, meist ubiquitär aktive Promotoren (z.B. der Promotor des Elongationsfaktor 1 α [EF- α]-Gens) Verwendung finden. In die *Bam*HI/*Eco*RV-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne von *thyroid peroxidase* (TPO)-kodierende cDNA-Bereich des Menschen (2602 bp; 859 Aminosäuren) einkloniert und am 3'-Ende noch mit einer für ein His₆-tag-kodierende Region und einem nachfolgenden Stopkodon versehen (TPO sol.-His-pcDNA3). Die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* vermehrt und mit Hilfe eines Plagen-Plasmidisolierungskits (Qiagen, Hilden) gereinigt.

2) Genetische Immunisierung von Mäusen

Für die genetische Immunisierung gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche DNA-Applikationsverfahren. Die intramuskuläre Injektion oder die intrakutane Applikation mit Hilfe Gasdruck-beschleunigter mikroskopisch kleiner, mit Plasmid-DNA umhüllter Goldpartikel (*gene gun*). Für das Beispiel verwendeten wir das *gene gun*-Verfahren. Dazu wurden 200 μ g TPO sol.-His-pcDNA3-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zur genetischen Immunisierung wurde bei fünf Mäusen nach Narkotisierung (intraperitoneal) mit 110 μ l Ketamin/Xylazin (100 mg/kg/16 mg/kg) das Bauchfell (ca. 4 cm²) mit parfümfreier Enthaarungscreme (Veet) entfernt und zweimal mit der *gene gun*

(Helios Gene Gun; Bio-Rad) beschossen. Pro "Schuß" wurden 1 µg Plasmid-DNA appliziert. Nach 19 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 14 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

Beispiel 2

Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins

Um Nachweis der spezifischen, durch die genetische Immunisierung gebildeten Antikörper muß das vom Expressionsplasmid kodierte Protein hergestellt werden. Um das Protein in nativer Form (ähnlich wie im immunisierten Tier) zu erhalten, wurde das Expressionskonstrukt durch Transfektion in BOSC23-Zellen [Pear et al., (1993) PNAS, 84, 8392-8396] gebracht. Bei den BOSC23-Zellen handelt es sich um eine modifizierte Adenovirus 5-transformierte humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293), die sehr gut transient transfizierbar ist. Die Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturschalen ausplattiert, so daß sie tags darauf eine 80%ige Konfluenz erreichten. Sie wurden dann dreimal mit je 2 ml serum- und antibiotikafreiem *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)-Medium gewaschen und mit 2 µg Expressionplasmid/10 µl Lipofectamin (Life Technologies, Eggenstein) in 1 ml serum- und antibiotikafreiem DMEM-Medium versetzt. Die DNA/Lipofektamin/Medium-Mischung wurde zuvor in einem Polystyrolgefäß zusammenpipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ wurden 2 ml DMEM/20% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. 24 h nach Transfektion (entspricht dem Zeitpunkt der DNA-Zugabe) wurde das Medium durch 5 ml DMEM/5% FCS ersetzt. Nach weiteren 48 h (72 h nach Transfektion) wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

Beispiel 3

Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt kodierte Protein gerichtet sind

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten His₆-tag-Protein (TPO sol.-His) an Nickelchelat-Mikrotiterplatten (DUNN, Asbach) wurden die Vertiefungen mit je 200 µl Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe oben) bzw. eines mock-transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes über Nacht bei 4°C inkubiert, dann viermal mit Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl) und zweimal mit Puffer B (phosphate buffered saline (PBS), 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation mit 300 µl 3 % Rinder-Serumalbumin (BSA)/PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und die Waschungen mit Puffer A und B wiederholt. Die Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurden 1:100 mit Puffer B verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Mäuseseren wurden in die Vertiefungen der Nickelchelat-Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je viermal mit Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20), zweimal mit Puffer B gewaschen und anschließend mit 100 µl 1:2000 mit Puffer B verdünnten Kaninchen anti-Maus-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Vertiefungen viermal mit Puffer C, zweimal mit Puffer B gewaschen, mit je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und in einem ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der hier vorgestellten Erfindung wurden die spezifischen, gegen TPO gerichteten Antikörper "klassisch" mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen

TPO-Antikörper-ELISAs (Varelisa TPO Antibodies; Pharmacia-Upjohn, Freiburg) nachgewiesen. Der Nachweis von anti-TPO-Antikörper erfolgt in diesem Testsystem durch gereinigtes rekombinantes TPO. Der anti-TPO-Antikörpergehalt der Präimmun- und Immunseren der immunisierten Mäuse wurde in einer Verdünnung von 1:100 nach Vorschrift des Herstellers bestimmt.

Ergebnisse:

Bei allen 5 mit TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierten Mäusen konnten, im Vergleich zu den Präimmunseren, bei einer Verdünnung von 1:100 eindeutig anti-TPO-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse mit Hilfe von gereinigtem TPO-Protein (Varelisa TPO Antibodies-Nachweissystem).

Maus	Optische Dichte ^{450 nm}	
	Präimmunserum	Immunserum
GV1	0,09	2,53
GV2	0,06	1,97
GV3	0,07	1,13
GV4	0,08	1,63
GV5	0,08	0,60

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Nachweissystems wurde beispielhaft das Präimmun- und Immunserum von zwei Mäusen untersucht. Ausgewählt wurde die Maus mit der höchsten (GV1) und die Maus mit der niedrigsten anti-TPO-Antikörperkonzentration (GV5) [siehe Tabelle 1]. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, können bei einer Serumverdünnung von 1:100 bei beiden Mäusen eindeutig anti-TPO-Antikörper im Immunserum nachgewiesen werden, während das Präimmunserum keine Reaktion zeigte. Bei einer Verdünnung von 1:500 konnten in den Immunseren keine anti-TPO-Antikörper mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Nachweis von anti-TPO-Antikörpern im Serum TPO sol.-His-pcDNA3-DNA immunisierter Mäuse mit Hilfe von durch transiente Expression erzeugtem TPO sol.-His-Protein.

Serum oder Puffer	Verdünnung mit Puffer A	Optische Dichte	
		TPO sol.-His	Medium
präimmun	1:100	0,17	0,15
immun	1:100	0,55	0,19
Puffer A	--	0,03	0,01

Beispiel 4

Herstellung von polyklonalen Antikörpern mit Hilfe genetischer Immunisierung ohne gereinigtes Antigen (Protein) in Kaninchen

1) Expressionskonstrukt für die genetische Immunisierung

Für das zweite Fallbeispiel wurde der ubiquitär aktive Promotor des Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α)-Gens zur Expressionssteuerung verwendet. Der verwendete Expressionsvektor basiert auf dem pBluescript-Vektor (Stratagene, Heidelberg), in den ein 1,2 kb Fragment des humanen EF-1 α -Genpromotors, ein 0,7 kb *EcoRI*-Fragment mit dem Polyadenylierungssignal der humanen G-CSF-cDNA (Mizushima und Nagata, 1990), sowie zwischen die *Bam*HI/*Not*I-Schnittstellen die für das Influenzavirus Hämagglutinin (HA)-tag-kodierende Oligonukleotidsequenz eingebaut wurden. In die *Cla*I/*Bam*HI-Schnittstellen der Polylinkersequenz wurde der für die extrazelluläre Domäne des Aktivinrezeptors IIA kodierende cDNA-Bereich des Menschen (431 bp; 135 Aminosäuren) so einkloniert, daß am 3'-Ende die HA-tag-kodierende Region und ein nachfolgendes Stopkodon zu liegen kam (pEF-1 α -ActRII-HA).

b) Genetische Immunisierung von Kaninchen

Es wurden zur genetischen Immunisierung 100 µg pEF-1α-ActRII-HA-DNA pro 25 mg Goldpartikel nach Vorschrift des Herstellers (*gene gun optimization kit*; Bio-Rad, München) aufgebracht. Zwei Kaninchen (Chinchilla Bastard; Charles River, Sulzfeld) wurden nach Narkotisierung mit 50 mg/kg Pentobarbital und Enthaarung von 200 cm² Bauchfell mit Enthaarungscreme dreissigmal mit der *gene gun* beschossen. Pro "Schuß" wurden 1 µg Plamid-DNA-Gemisch appliziert. Nach 21 Tagen wurde die Immunisierung wiederholt und 21 Tage später Blut zur Bestimmung der Menge an spezifischen Antikörpern entnommen.

Beispiel 5

Expression des Expressionskonstrukt-kodierten Proteins

Die Herstellung des vom Expressionsplasmid pEF-1α-ActRII-HA kodierten Proteins durch transiente Transfektion von BOSC23-Zellen erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 6

Nachweis von spezifischen Antikörpern, die gegen das vom Expressionskonstrukt-kodierte Proteins gerichtet sind

Zur Bindung des durch transiente Transfektion hergestellten HA-tag-Protein (EF-1α-ActRII-HA) an Mikrotiterplatten wurden die Vertiefungen zunächst mit dem F(ab)₂-Fragment des anti-HA-tag-Antikörper beschichtet. Dazu wurden 150 µl des Antikörperfragments je Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und freie Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl 0,2% BSA/PBS blockiert.

Anschließend wurde der Überstand des transienten Transfektionsansatzes (siehe Beispiel 5) bzw. eines mock-

transfizierten BOSC23-Kulturüberstandes für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann dreimal mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Die Präimmun- und Immunseren der immunisierten Kaninchen wurden 1:100 bzw. 1:500 mit 0,2% BSA/PBS verdünnt. Jeweils 100 µl der verdünnten Kaninchenserum wurden in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen je dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 1:2000 mit PBS/0,2% BSA verdünnten Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Peroxydasekonjugat (DAKO, Hamburg) versetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen, mit je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. Die Farbreaktion wurde nach ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und in einem ELISA-reader gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren auch in Kaninchen spezifische polyklonale Antikörper gegen ein unbekanntes Genprodukt erzeugt werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,

b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und

c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt a) verwendete Vektor am C-Terminus der für das Polypeptid kodierenden DNA eine Sequenz aufweist, die für das Auffindungssignal kodiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffindungssequenz ausgewählt ist aus der His₆-tag-Sequenz, der Hämagglutinin-Sequenz eines Influenzavirus oder der myc-tag-Sequenz.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am C-terminalen Ende der Auffindungssequenz eine Polyadenylierungssequenz aufweist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der für das Polypeptid kodierende Vektor am 5'-Ende der für das Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz einen starken Promotor aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der starke Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus starken eukaryotischen Promotoren, insbesondere dem Promotor des Elongationsfaktors 1 α oder des Cytomegalovirus-Promotors.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA, die gemäß Schritt b) direkt in ein Tier eingebracht wird in einem Vektor vorliegt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Polypeptid kodierende DNA in Schritt b) mit Hilfe einer gene gun in das Tier eingebracht wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem in Schritt b) eingesetzten Tier um eine Maus, eine Ratte oder ein Kaninchen handelt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) zusätzlich zu der für das Polypeptid kodierenden DNA ein genetisches Adjuvans appliziert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das genetische Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Zytokinexpressionsvektoren, die die Antikörperproduktion erhöhen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß geeignete Zellen eines gemäß Schritt b) immunisierten Tieres für die Herstellung von

Hybridomazellen zur Bildung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt a) gebildete Polypeptid durch Bindung des Auffindungssignals an einen hiergegen gerichteten Antikörper oder ein Antikörperfragment an eine feste Phase gebunden wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der festen Phase um Mikrotiterplatten, Gelkügelchen oder magnetische Kügelchen handelt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt b) gebildete Antikörper nach Bindung an das in Schritt a) gebildete Polypeptid mit Hilfe eines gegen den Antikörper gerichteten Anti-Antikörpers nachgewiesen wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt c) an das exprimierte Polypeptid gebundene Antikörper durch Elution freigesetzt wird.

17. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er nach einem der Verfahren gemäß Anspruch 1-17 erhältlich ist.

Zusammenfassung

Offenbart wird ein Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die spezifisch mit einem Polypeptid reagieren von dem die kodierende Nukleinsäure bekannt ist, worin

- a) die für das Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors, der wenigstens eine für ein Auffindungssignal kodierende Sequenz aufweist, in einer Wirtszelle exprimiert wird und das exprimierte Polypeptid mit Hilfe des Auffindungssignals an eine feste Phase gebunden wird,
- b) unabhängig von Schritt a) die für das Polypeptid kodierende DNA direkt in ein Tier eingebracht wird, wodurch eine Expression des Polypeptids in dem Tier erfolgt, die die Bildung von Antikörpern gegen das Polypeptid verursacht und
- c) die in Schritt b) gebildeten Antikörper mit dem in Schritt a) gebildeten Polypeptid umgesetzt und nachgewiesen oder angereichert werden.